

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-199656
(43)Date of publication of application : 19.07.1994

(51)Int.CI. A61K 9/08
A61K 31/725
// C08B 37/08

(21)Application number : 04-358752 (71)Applicant : HOYA CORP
(22)Date of filing : 28.12.1992 (72)Inventor : SUZUKI HIROHITO
ISHIDA KOICHI

(54) METHOD FOR REMOVING PYROGEN

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a pyrogen-removing method capable of simply removing pyrogen mixed in a solution at a low cost without substantially reducing the pyrogen-removing effect even in the case of a solution having high viscosity.

CONSTITUTION: Pyrogen is removed from a solution containing pyrogen and having 20000-60000 centistoke kinematic viscosity at 37°C by passing the solution through a filter positively charged in a solution at pH6-10.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 05.11.1999
[Date of sending the examiner's decision of rejection] 23.10.2001
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-199656

(43)公開日 平成6年(1994)7月19日

| | | | | |
|---------------------------|------|---------|-----|--------|
| (51) Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 序内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| A 6 1 K 9/08 | L | 7329-4C | | |
| | U | 7329-4C | | |
| | V | 7329-4C | | |
| 31/725 | | 8314-4C | | |
| / C 0 8 B 37/08 | Z | 7433-4C | | |

審査請求 未請求 請求項の数2 (全5頁)

| | | |
|----------|------------------|---|
| (21)出願番号 | 特願平4-358752 | (71)出願人 000113263 ホーヤ株式会社 東京都新宿区中落合2丁目7番5号 |
| (22)出願日 | 平成4年(1992)12月28日 | (72)発明者 鈴木 洋仁 東京都新宿区中落合2丁目7番5号 ホーヤ株式会社内 (72)発明者 石田 耕一 東京都新宿区中落合2丁目7番5号 ホーヤ株式会社内 (74)代理人 弁理士 吉井 一男 |

(54)【発明の名称】 バイロジエンの除去方法

(57)【要約】

【構成】 バイロジエンを含有し、37℃において2万～6万センチストークスの粘度を有する溶液を、pH6～10において溶液中で正に帯電したフィルターに通すことにより、前記溶液からバイロジエンを除去する。

【効果】 溶液中に混入したバイロジエンを簡便に且つ低コストで除去することができる。このバイロジエン除去効果は、バイロジエンを含有する溶液が高い粘性を有する場合にも実質的に減殺されない。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 バイロジエンを含有し、37℃において2万～6万センチストークスの粘度を有する溶液を、pH 6～10において溶液中で正に帯電したフィルターに通すことにより、前記溶液からバイロジエンを除去することを特徴とするバイロジエンの除去方法。

【請求項2】 前記バイロジエンを含有する溶液がヒアルロン酸塩の溶液であることを特徴とする請求項1記載のバイロジエンの除去方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、液体に混入するバイロジエンを除去する方法に関するものであり、特に、眼科用剤として用いられるヒアルロン酸ナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等の粘弹性物質に混入するバイロジエン除去に好適なバイロジエン除去方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来より、医療用の潤滑剤としてヒアルロン酸塩に代表されるムコ多糖類が一般に使用されている。また近年、前眼部手術、例えば白内障手術、緑内障手術、角膜移植、人工眼内レンズ移植等の手術時に、前房中に粘弹性を持つヒアルロン酸塩の製剤を注入して手術操作を実施することによって、組織表面の損傷を防ぎ、縫合などの手技を安全かつ確実に実施でき、また手術後の癒着を防ぐことができるため、このような手法が一般的に利用されている。

【0003】 一般に、上記ヒアルロン酸塩は主にニワトリのトサカや硝子体から抽出しているため、このようにして得られた抽出体には、ヒアルロン酸塩の外にバイロジエン等が含有されている。

【0004】 このバイロジエンは、生体に投与すると発熱を起こす物質の総称であり、発熱物質、発熱因子とも呼ばれる。バイロジエンの中で最も発熱に関与する物質は、細菌由来のものであり、一般に外毒素（エクソトキシン）、及び内毒素（エンドトキシン）に大別されている。これらの毒素のうち、大腸菌などのグラム陰性菌において、多糖類と結合した脂質の複合体、リボ多糖体（リボポリサツカライド：LPS）を主とする内毒素が最も強い発熱性を持ち、体内投与により発熱の他、ショックや白血球の増加を誘引する。

【0005】 したがって、上記ヒアルロン酸塩を生体に使用する場合は、上記ヒアルロン酸塩抽出体からバイロジエンを除去する必要がある。

【0006】 バイロジエンの除去方法としては、膜によるろ過（特開昭58-73371号公報）など、分子量の差を利用する方法、ヒスチジンを結合させた担体（特開昭57-183712号公報）などを用いて、バイロジエンを吸着させる方法などがある。

【0007】 また、特開平2-193913号公報に

10

2

は、金属イオンを配位させた担体に生理活性物質を吸着させ、その後洗浄によりバイロジエンを除去した後、更に前記生理活性物質を緩衝液で溶出させることにより、バイロジエンを含まない生理活性物質を緩衝液で溶出させて、バイロジエンを含まない生理活性物質を得る方法が記載されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、前述した方法は、いずれも繰りかえし操作を行う必要があるため工程が複雑となってしまい、低コストで簡便にバイロジエンを除去することが可能な方法ではなかった。

【0009】 特に、溶液が高粘性（2万～6万センチストークス）の場合、この高粘性溶液中に混入されているバイロジエンは、前記特開昭58-73371号公報の方法による場合、細かいフィルターでは溶液が通過できず、粗いフィルターでは、バイロジエンも通過するので、溶液からのバイロジエンの除去は困難であった。また前述した特開昭57-183712号公報及び特開平2-193913号公報の方法でも、最終的にフィルターを通過させることが必要であるが、細かいフィルターでは、溶液が通過できず、粗いフィルターでは、バイロジエンを吸着した物質も通過するので、溶液からのバイロジエンの除去は困難であった。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、上述した従来技術の問題点を解決し、高粘性溶液に対しても簡便且つ低コストでバイロジエンを除去することができる溶液中のバイロジエン除去方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】 本発明者は鋭意研究の結果、特定のpH領域で正に帯電したフィルターが上記バイロジエンの除去に極めて効果的であることを見出し、更には、このようなフィルターのバイロジエン除去効果は、バイロジエンを含有する溶液が高い粘性を有する場合にも実質的に減殺されることを見出した。

【0012】 本発明のバイロジエン除去方法は上記知見に基くものであり、より詳しくは、バイロジエンを含有し、37℃において2万～6万センチストークスの粘度を有する溶液を、pH 6～10において溶液中で正に帯電したフィルターに通すことにより、前記溶液からバイロジエンを除去することを特徴とするものである。

【0013】 以下、本発明を詳細に説明する。

（バイロジエン含有溶液） 本発明の方法を適用可能なバイロジエン含有溶液の種類等は特に制限されないが、本発明の方法は、粘弹性物質を（例えば主成分として）含む溶液に、特に好ましく適用される。このような粘弹性物質の例としては、ヒアルロン酸ナトリウム、セルロース類、コンドロイチン硫酸等が挙げられる。上記セルロース類としては、メチルセルロース、ヒドロキシプロピ

ルメチルセルロース等が挙げられる。

【0014】これらの粘弹性物質ないし高分子物質の好ましい濃度は、用いられる物質によって各々異なるが、例えばヒアルロン酸ナトリウムは1～2%程度（特に1%程度）、メチルセルロース及びヒドロキシプロビルメチルセルロースは、2～5%程度（特に2%程度）、コンドロイチン硫酸は、20～50%程度である。これらの粘弹性物質の溶液のpHは、通常は弱酸性か弱塩基性（より具体的にはpH6～8）であることが好ましい。

【0015】本発明のバイロジエン除去方法は、バイロジエンを含有する溶液が比較的高粘度、より具体的には37℃における粘度が2万センチストークス以上（更には2万～6万センチストークス程度）である場合にも、そのバイロジエン除去効果が実質的に減殺されないので、特に効果的に用いられる。

【0016】本発明において、上記粘度の測定は、例えばコーン・プレート型回転粘度計を用い回転数0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 rpmの粘度を測定し、すり速度-粘度の対数の関係から、見かけ上の回転粘度として測定することが可能である。

【0017】本発明においては、上記したバイロジエン含有溶液に、必要に応じて、等張化剤、緩衝化剤等の添加剤を添加することができる。

【0018】等張化剤としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム等の公知の無機塩類が用いられる。

【0019】緩衝化剤としては、例えば、リン酸一カリウム-リン酸二カリウム、リン酸一ナトリウム-リン酸二ナトリウム、ホウ酸-ホウ砂等が用いられる。

【0020】（フィルター）本発明のバイロジエン除去方法において用いられる「pH6～10で正に帯電したフィルター」としては、通常はメンブレンフィルターが好ましく用いられる。本発明において、上記フィルターがpH6～10において正に帯電していることは、例えば該pH領域において、上記フィルターのゼータ電位を測定することにより確認することが可能である。このゼータ電位の測定に関しては文献（セラミックス、19, No.1, 38～42 p (1984)）を参照することができる。

【0021】「pH6～10で正に帯電したフィルター」を得る方法は特に制限されないが、該フィルターとしては、ポリアミド樹脂（例えばナイロン-66）を一成分とする共重合体からなる膜が好ましく用いられる。一例として、ナイロン-66（ポリアミド樹脂）に少量のエポキシ樹脂を加えて交叉結合（crosslinking）させてなる膜（メンブレン）が好ましく用いられる。上記メンブレンフィルターとしては市販のフィルターを使用することも可能である。このような市販フィルターとしては、例えば日本ポール（株）製の「ポジラインフィルター（商品名）」が挙げられる。

【0022】上述したように、所定のpH領域（pH3

～10、特にpH6～10）において溶液中で正に帯電しているフィルターを用いた場合、その静電吸着力に基づき、本来のフィルターの定格ろ過精度よりはるかに小さいバイロジエン（例えば溶液中で負に帯電したバイロジエン）を除去することが可能となると推定される。

【0023】本発明において、pH6～10で正に帯電したフィルターの定格ろ過精度（μm）は、0.65～3.0であることが好ましい。この定格ろ過精度が0.65未満では溶液の粘度が比較的高い場合に目づまりを起こしやすく、得られたろ液の粘性が低下するおそれがあり、一方、3.0を越えるとバイロジエン除去効率が不充分となり易い。特に、バイロジエンを含有する溶液が粘度20,000～60,000センチストークスの高粘性溶液の場合には、定格ろ過精度は0.8μm以上1.2μm以下であることがより好ましい。

【0024】上述したようなpH6～10で正に帯電しているフィルターに代えて、同pH領域で負に帯電したメンブレンフィルターを用いた場合、負に帯電しているバイロジエンとは静電吸着が起らないので、静電吸着によっては該バイロジエンを除去することができない。したがって負帯電のメンブレンフィルターを用いて上記バイロジエンを除去するには、0.45μm以下の定格ろ過精度のフィルターを用いることが必要となる。ところが、定格ろ過精度が0.45μm以下のメンブレンフィルターを用いた場合は、高粘性溶液をろ過しようとすると目づまりが極めて生じ易いため、高粘性溶液のろ過は極めて困難である。

【0025】（フィルターによるろ過）本発明においては、上記したようなフィルターでバイロジエン含有溶液をろ過する際、温度を高くすると上記溶液の見かけ上の粘度が低下するため、目づまりを起こしにくくなりろ過速度が速くなる。また、本発明者の知見によれば、正に帯電させたフィルターの有するバイロジエンの除去効果は、温度を高くすることにより向上する。したがって、正に帯電させたフィルターを用いる際のろ過温度は、そのフィルターの特性の変化及び溶液の主成分（例えば高分子物質）の特性が変化を生じない範囲内において、できるだけ高いことが好ましい。このろ過温度の好ましい範囲は、用いるフィルターおよび溶液の成分の種類によって変動するが、通常は30～80℃（更には50～80℃）の範囲が好ましい。

【0026】例えば、ヒアルロン酸ナトリウム水溶液（pHは約7）に混入しているバイロジエンを除去するためのろ過温度は、80℃以下で、且つできる限り80℃に近い温度が好ましい。80℃を超えた温度でろ過した場合、ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の粘性が低下し、ヒアルロン酸ナトリウムの物性が変化してしまうおそれがある。

【0027】ろ過速度はろ過時の圧力を高くすることにより、速くなるので、正に帯電させたフィルターにより

バイロジエンを除去する際の最大ろ過圧力は、上記フィルターの許容耐差圧 (kg/cm^2) 範囲内で、できるだけ高いほうが好ましい。この場合、ろ過の初期の段階においてはろ過圧力をやや低い値（例えば $1\text{ kg}/\text{cm}^2$ ）とし、ろ過速度の低下に対応して徐々に（段階的にあるいは連続的に）ろ過圧力を最大ろ過圧力（許容耐圧差）に至るまで増大させることが好ましい。より具体的には、例えば、 $1\text{ kg}/\text{cm}^2 \rightarrow 2\text{ kg}/\text{cm}^2 \rightarrow 3\text{ kg}/\text{cm}^2 \rightarrow$ 最大ろ過圧力のように、ろ過圧力を変化させることが好ましい。例えば、前述した日本ポール（株）製の「ポジライン・フィルター」においては、許容耐圧差は $50 \sim 80^\circ\text{C}$ では $4.2\text{ kg}/\text{cm}^2$ であり、 50°C 以下では、 $5.6\text{ kg}/\text{cm}^2$ である。

【0028】以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0029】

【実施例】

実施例1

粘弹性物質であるヒアルロン酸ナトリウム 10 g を注射用水 990 g に溶解し、高粘性の 1% ヒアルロン酸ナトリウム水溶液（ 37°C における粘度 $41,000$ センチス Tokus）を調製した。

【0030】pH $6 \sim 10$ において正に帯電するディスク*

*クメンブレンフィルター（定格ろ過精度 $0.8\text{ }\mu\text{m}$ 、直 径 142 mm 、日本ポール（株）製のポジラインフィルター（商品名））を用い、ろ過温度（高粘性水溶液の液温） 25°C の条件で上記ヒアルロン酸ナトリウム水溶液のろ過を行った。この際のろ過圧力は、当初は $1\text{ kg}/\text{cm}^2$ とし、ろ過速度の低下に応じて、徐々に $4.2\text{ kg}/\text{cm}^2$ （最大ろ過圧力）まで変化させた。

【0031】ろ過前後のエンドトキシン量（バイロジエン量）と粘度を下記表1に示す。

実施例2

ろ過温度を 70°C とした以外は、実施例1と同様の方法でヒアルロン酸ナトリウム水溶液のろ過を行った。

【0032】実施例3

ろ過温度を 80°C とした以外は、実施例1と同様の方法でヒアルロン酸ナトリウム水溶液のろ過を行った。

【0033】比較例1

実施例1で用いた正帯電のフィルターに代えて、正に帯電していない通常のディスク・メンブレンフィルター（日本ポール（株）製のメンブレンディスク（商品名））を用いた以外は、実施例1と同様の方法でヒアルロン酸ナトリウム水溶液のろ過を行った。

【0034】

【表1】

| 例 号 | 番 号 | ろ 過 温 度 ($^\circ\text{C}$) | エンドトキシン量 (pg/ml) | | 粘度 (センチス Tokus) | |
|-------------|--------|--|------------------------------------|-------------|-----------------|-------------|
| | | | ろ 過 前 | ろ 過 後 | ろ 過 前 | ろ 過 後 |
| 実 施 例 | 1 | 25 | 1000 | 100 | 41000 | 41000 |
| 2 | 70 | 1000 | | 50 | 40000 | 39000 |
| 3 | 80 | 1000 | | 30 | 41000 | 39000 |
| 比 較 例 | 1 | 25 | 1000 | 1000 | 39000 | 38000 |

【0035】上記表1から明らかなように、実施例1～3で用いた「pH $6 \sim 10$ で正に帯電したフィルター」は比較例1で用いた通常のフィルターに比べ、バイロジエン（エンドトキシン）除去効果が優れている。

【0036】また、上記表1から明らかなように、ろ過温度を高くすることにより、バイロジエン除去効果は増大する。

【0037】エンドトキシン量測定方法

上述したヒアルロン酸ナトリウム水溶液中のバイロジエンたるエンドトキシンの量は、市販の血漿中エンドトキシン定量試薬キット、エンドトキシンテスト-D（生化学工業社製）を用いた比色法より測定した。

【0038】より具体的には、実施例1で調製した 1% ヒアルロン酸ナトリウム水溶液を 10 倍希釈し、検体を調製した。上記エンドトキシンテスト-Dの反応管（主剤）に、同キットに付属の緩衝液 $100\text{ }\mu\text{l}$ を加え、直

ちに上記検体 $100 \mu l$ を加えて、37°Cで30分後インキュベートした後545nmの吸光度を測定した。上記と同様の操作はエンドトキシン標準液に対して行ない、検量線を求めた。エンドトキシン標準液に基づく検量線を用いて上記検体中のエンドトキシン量を求め、その結果を10倍して、上述した1%ヒアルロン酸ナトリ

ウム水溶液中のエンドトキシン量を算出した。

【0039】

【発明の効果】 上述したように本発明のバイロジエン除去方法によれば、高粘性の溶液中に混入したバイロジエンを簡便に且つ低コストで除去することができる。